A. Ü. Vet. Fak. Derg.
33 (3) : 394–407, 1986

SEKİZ HÜCRELİ FARE EMBRİYOLLARININ DONDURULMA VE ÇÖZDÜRÜLMELERİ

S. Çetin Kılıçoğlu

Freezing and thawing of eight-cell mouse embryos

Summary: *In this study the effect of subzero temperatures on 8-cell mouse embryos was examined. Female mice, 8 weeks old, were induced to superovulate by intraperitoneal injections of gonadotropic hormones. 8-cell embryos were recovered from the oviduct and the anterior portion of the uterine horns at 68–72 hours after the injection of human chononic gonadatrophin (HCG). The mouse embryos were collected in Phosphate Buffer (PBI) and washed in several changes of PBI to remove the debris. Before freezing Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added in six increments to samples consisted of 10–20 8-cell mouse embryos, the final concentration of DMSO was 1.5 M. The samples were equilibrated for 15 minutes at room temperature to ensure complete permeation of the additive into embryos and after that embryos were placed in each of several 10x100 mm Pyrex test tubes containing 0.2 ml. PBl at room temperature. Tubes cooled to —6°C and seeded with a seeding forceps to induce ice formation, then slowly cooled (0.3 C / min.) in 1.5 M DMSO to —33°C before direct transfer to liquid nitrogen. For freezing embryos a mini-freezer unit type R202 / 101R was used.*

For thawing the tubes were placed straight into a water bath at 25–30°C and agitated.

To reduce osmotic shock embryos were recovered and washed in three changes of PBl at room temperature. Mouse embryos were transfered to drops of PBl under paraffin oil. These embryos were then cultured to assay viability at 37°C for 48 hours in 5 % CO_2 in air. Survival was assessed by the ability of the frozen-thawed 8–cell embryos to develope into expanded blastocysts during culture. The highest levels of survival

* Prof.Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Ankara.

in vitro of slowly cooled and rapidly thawed (275–500 °C / min.) 8–cell embryos were 75 % of 320 embryos. Out of 320 frozen and thawed 8–cell mouse embryos 240 embryos developed into blastocysts in culture after storage at —196 °C for up to three days.

Özet: *Bu çalışmada 8 hücreli fare embryolarının dondurulma, —196 C derecede tutulma ve çözdürülmeleri sonu yaşama kaabiliyetleri in vitro olarak incelenmiştir. Bu amaçla 8 haftalık dişi farelere Pregnant mare's Serum Gonodotrophin (PMSG) 48 saat sonrada Human chorionic Gonadotrophin (HCG) intra-peritoneal enjekte edilerek süperovulasyon sağlandı. Hormonlarla uyarılan dişiler erkeklerle çiftleştirilmelerinden sonra gebeliğin ikinci günü sonunda cervical dislokasyonla öldürülen farelerin oviduct ve uteruslarının anterior dilimlerinden toplanan embriyolar PBl içine alındılar. Dondurma öncesi altı aşamada içinde son konsantrasyonu 1.5 M Dimethyl sulfoxide (DMSO) olacak şekilde DMSO karıştırılan örnekler katkı maddesinin daha rahat etkilemesi için 15 dakika süreyle oda ısısında tutuldular. Daha sonra 10–20 adet sekiz hücreli embriyo bir test tüpüne 0.2 ml.PBl içersinde konuldular. Tüpler ilk etapta —6 °C dereceye kadar soğutuldu ve bu derecede özel forceps kullanılarak içersinde buz kristalleri oluşturulduktan sonra da yavaş yavaş (0.3 °C / dak.) —33 C dereceye kadar dondurudular. —33 C derecedeki tüpler hemen sıvı azota sokulup orada 3 gün süreyle tutuldular. Embriyoların dondurulmaları R202 / 101R tipi bir mini dondurucu ile gerçekleştirilmiştir.*

Çözülmenin sağlanması için tüpler sıvı azottan çıkarıldıktan hemen sonra 25–30 C derecedeki su banyosuna sokulup çalkalandılar.

Osmotik basıncı azaltmak için embriyolar oda ısısında PBl de yıkandılar ve ufak petride parafinle kaplı PBl in içine transfer edildiler. Etüvde 37 C derecede % 5 CO_2 li ortamda 48 saat korunan embriyoların gelişmeleri izlendi. Sekiz hücreli 320 embriyonun dondurulup, 3 gün —196 C derecede tutulmaları ve sonra çözdürülmeleri sonu 240 tanesi kültürde blastosüst aşamasına gelmiştir.

Giriş

1949 yılında Polge, ve ark'ın (11) glycerolün spermatozoa için soğuktan koruyucu olarak etki yaptığını saptamalarından sonra süt ve et veriminde artışlar olmuştur. Donmuş spermatozoanın sun'i tohumlamada kullanılmasıyla arzu edilen genetik yapıya sahip erkek hayvanların kullanımı tüm dünya yüzeyine yayılmıştır.

Ancak genetik yönden süper dişilerin kullanımı embriyolarının uygun bir şekilde toplanıp sağlıklı dağıtımları yapılamadığı için çok sönük kalmıştır.

1950'lerde spermatozoanın başarılı bir şekilde dondurulması memeli ovumlarının dondurulması için yoğun çalışmalara neden olmuş ancak başarıya ulaşılabilmesi için çeyrek yüzyılın geçmesi gerekmiştir.

İlk başarılı haber Whittingham ve arkadaşlarının (21) fare embriyolarını dondurmaları sonu dünyaya duyurulmuştur, aynı sene içersinde Wilmut (28) bu konuda başarılı ikinci araştırıcı olmuştur.

Whittingham ve arkadaşları (21) fare embriyolarını dondurmada soğuktan koruyucu olarak 1 M DMSO kullanmışlardır. Embriyoları yavaş yavaş (0.3 — 2 C° / dak.) dondurmuşlar, başarılı sonuçların alınabilmesi için bu dondurma hızına —4 ile —60 C dereceler arasında dikkat edilmesi gereğini vurgulamışlar ve kullanma süresi içinde de yavaş çözülmesine (4–25 C° / dak.) özen göstermişlerdir. Fare embriyoları 8 gün süreyle —196 C° ve —269 C derece soğukta tutulmuşlar ve bu süre sonunda yavaş çözülmeden sonra taşıyıcı farelere transfer sonu bazı canlı fare yavruları elde edilmiştir.

Wilmut (28) çalışmasında embriyoları 1.5 M DMSO de, yavaş dondurmaya (0.2 C° / dak.) çalışmış, yavaş çözülme hızı (12 C° / dak.) ile de dondurulup çözdürülmüş embriyoların % 65'inin invitro gelişmeğe devam ettiklerini bildirmiştir.

Whittingham ve arkadaşları (21), Wilmut (28) fare embriyolarının canlı kalabilmelerinin çözülmenin 4 C° ile 25 C° / dakika arasında yapılmasıyla mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Muyomoto-Ishibashi (10) fare ve rat embriyolarını soğuktan koruyucu 1.2 M ethylen glycol kullanarak dondurmuşlardır. Sekiz hücreli fare embriyolarını soğuktan koruyucu ethylene glycolde — 5 C dereceye kadar 1 C° / dakikada, bu derecede kristalizasyon oluşturulduktan sonra 0.5 C° / dakikada —79 C° ye, —79 C° den —120 C° ye kadar 0.3–0.5 C° / dakikada dondurmuşlar ve hemen sonra doğrudan sıvı azota sokmuşlardır. Embriyoların 3 saat, 30 gün ve 180 gün sıvı azotta saklanmalarından sonra 15 C° / dakikada çözülmelerini sağlamışlardır. Embriyoların sırasıyla % 76, % 71 ve % 78 oranında canlı kaldıklarını saptamışlardır.

Whittingham (18) rat embriyolarının dondurulmasında (—196 C°) 1.5 M DMSO kullanmış, embriyoları 0.6 C° —1.0 C° / dakika yavaş dondurup 5 C° / dakika yavaş çözülmelerini sağlamıştır. Daha sonra embriyoların in vitro gelişmelerini izleyen araştırıcı 8 hücreli embriyoların tam gelişmelerine karşın 4 hücrelilerin in vitro gelişmediğini 2 hücrelilerin de ancak % 30'unun 4 hücreli hale geçtiklerini vurgulamıştır.

Schneider ve arkadaşları (14) fare embriyolarının DMSO ile dondurulmaları sonu 4 ve 8 hücreli embriyoların sırasıyla % 97.5 ve % 77.2 oranında in vitro blastosüst aşamasına kadar geliştiklerini, kontrol olarak bırakılan, dondurma işlemi uygulanmayan diğer grupta bu gruba göre % 6.4 lük daha fazla gelişmenin olduğunu görmüşlerdir.

Whittingham (17) iki aşamada 1.5 M DMSO oluşturulan PBl vasatlarındaki blastosüstleri 5 dakika süreyle 0 C°'de tutmuş, daha sonra kristalleşmenin oluşturulduğu —4.5 C°'deki banyolara naklet-miş ve ve blastosüstleri 0 C° den — 80 C dereceye 0.40 ∓ 0.07 C derece / dakikada dondurmuş ve hemen sonra sıvı azota sokmuştur. — 196 C derecede 3 saat ile 31 gün arasında tutulan blastosüstler çözdürülmeleri esnasında — 110 C dereceden 0 C dereceye 4.25 ± 0.24 C° / dakikada getirilmişlerdir. Whittingham (17) değişik süreler sıvı azotta tutulan blastosüstlerin taşıyıcılara transferlerinden hemen hemen aynı sonuçların elde edildiğini, sıvı azotta kalma süresinin elde edilen canlı fare yavrusu sayısına olumsuz etki yapmadığını belirtmiştir.

Maurer (7) memeli embriyolarının viabilitelerini koruyabilmeleri için uygun ortamlarda saklanmalarının gereğini vurgulamış ve DMSO veya glycerol gibi soğuktan koruyucuların ortama kademeli olarak ilavesi ve uzaklaştırılmasıyla, yavaş dondurma (0.1 — 20 C° / dakika) ve yavaş çözülmeyle (1–50 C° / dakika) bu hususun başarılabileceğini belirtmiştir.

Willadsen (23) ve Willadsen ve arkadaşları (25) koyun ve inek embriyolarının dondurulmalarında değişik bir yöntem kullanmışlardır. Bu amaçla 20 C° de Phosphate Buffer Saline (PBS) deki 1.5 M DMSO i 3 aşamada (0.5 M 10 dak., 1.0 M 10 dak., 1.5 M 30–40 dak.) oluşturmuşlardır. Dondurma işlemi PBS + 1.5 M DMSO içindeki embriyolar — 36 C° ye kadar 0.3 C° / dakikada — 6 C° de buz kristalleri oluşturduktan sonra dondurmuşlar ve daha sonra sıvı azota tüpleri naklet-meden önce — 36 C° — 60 C° arasında da ortamın ısısını 0.1 C° /

dakikada hızda düşürmüşlerdir. Çözülmede ise tüplerdeki 7 günlük donmuş inek morulae ve blastosüstlerini — 50 C° ye etanol banyosunda getirmişler, daha sonra — 50 C° den 4 C° / dakikada — 10 C° ye oradanda 20 C° deki su banyosuna transfer edip çözülmenin tamamlanmasını sağlamışlardır. PBS deki soğuktan koruyucu 1.5 M DMSO 6 aşamada (taze 1.5 M DMSO de 5 dakika, 1.25 M, 1.0 M, 0.75 M, 0.5 M ve 0.25 M DMSO de 10 ar dakika ve sonuçta da sadece PBS) uzaklaştırılmıştır.

Yine Willadsen (24) ve Willadsen ve ark. (26) sığır embriyolarını hızlı dondurma yönteminde DMSO'i PBSa 3 aşamada karıştırmışlardır. Oda ısısında 0.5 M DMSO'de 10 dakika, 1.0 M DMSO'de 10 dakika, 1.5 M DMSO'de 30–50 dakika tutuktan sonra içinde embriyolar ve 1.5 M DMSO olan — 6 C veya — 7 C° ye 1 C° /dakikada indirmiş bu derecede kristalizasyonu yaptıktan sonra tüpler içindeki embriyoları — 6 C°'den — 30 C°'ya 0.3 C° / dakikada ve — 30 C°' den — 33 C°'ye de 0.1 C° / dakikada dondurmuşlardır. — 33 C° de ampul doğrudan sıvı azota sokulmuştur. Çözülme için ampuller sıvı azottan çıkarılır çıkarılmaz hemen 25 C°'lik su banyosuna yerleştirilmişlerdir. DMSO'nun PBS den uzaklaştırılması 6 aşamada (1.5 M DMSO li PBS de 5–10 dakika, 1.25 M, 1.0 M, 0.75 M, 0.50 M, 0.25 M DMSO'de 10 ar dakika bekletildikten sonra PBS ye alınmıştır) gerçekleştirilmiştir.

Smorag ve ark. (15) toplam 1161 adet 8–16 hücreli fare embriyosunu ve 31 adet sığır morulae ve blastosüstünü sıvı azota nakletmeden önce — 40 C°'ye kadar donmuşlardır. Üç değişik soğuktan koruyucu DMSO, glycerol, ethylene glycol kullanan Smorag ve arkadaşları (15) embriyoları içeren Dulbecco vasatını 0 C° de 5–10 dakika tuttuktan sonra — 6 C°'deki su banyosuna geçmişler, 3 dakika bu ısıda tutulan test tüplerinde kristalizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Embriyoları — 6 C°'den — 40 C°'ye kadar 0.3 C° / dakikada dondurmuş, — 40 C°'de 30 dakika tutulan embriyoları hemen sıvı azota sokmuşlardır. 12 saatle bir kaç ay sıvı azotta korunan embriyoları 45 C° / dakikada çözdürmüşlerdir. Soğuktan koruyucuları 3 aşamada embriyoların içinde bulunduğu vasattan uzaklaştırmışlardır. Fare embriyolarının glycerolde dondurulmalarından sonra % 88'inin in vitro blastosüst aşamasına kadar geliştiğini bildirmişlerdir.

Bir dişiden diğer bir dişiye embriyo transferi her geçen gün Veteriner Hekimlikte daha da yaygınlaşmaktadır. Non-şirurjikal yöntemlerin geliştirilmesi ile genetik yönden süper hayvanlardan daha kolay

yararlanmak ve ülkelerin hayvan populasyonlarına çok verimli ırkları sağlıklı ortamlarda sokmayı istemeleri nedeniyle embriyo transferi bir alternatif ve hatta gereksinim olarak belirmektedir.

Embriyo transferi çalışmalarının bir bölümü olan embriyoların dondurularak saklanmalarının da pek çok olumlu yönleri vardır. Dondurulmuş embriyoların sun'i tohumlama uygulanır gibi yaygınlaşması, embriyoların donorlarda her hangi bir enfeksiyonun olup olmadığının kontrolu süresince karantinada tutulması, donmuş embriyoların uzun mesafelere ve ıssız köşelere gönderilmesi, embriyo bankalarının oluşturulması ve transfere hazır embriyolar ile taşıyıcıların endometrial gelişimi arasındaki uyumun kolaylıkla sağlanması bu özelliklerden olarak sayılabilirler.

Bu çalışma evcil hayvanlarda yapılacak yukarıda saydığımız çalışmalara baz oluşturmak amacıyla ele alınmış ve fare embriyolarının dondurulmaları gerçekleştirilmiştir.

Materyal-Metot

C57Bl / 6J ooxCBA / Ca oo.nın 8 haftalık F^1 hibrid dişlerine (13 adet) 5 I.U. Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, Intervet, Folligon) intraperitoneal verilmesinden 48 saat sonra 5 I.U. Human Chrionic Gonadotrophin (HCG, Intervet, Chorulon) intraperitoneal enjekte edilerek süperovulasyon oluşturuldu (2, 13,20,21).

Hormonlarla uyarılan dişiler son enjeksiyondan hemen sonra her erkeğe bir dişi olacak tarzda erkeklerle (CFLP) aynı kafeslere kondular. Erkeklerle bir gece bir arada tutulan dişilerden ertesi günün sabahı vaginal tıpaları olanlar olmayanlarda ayrıldılar (2,13,14,21).

Embriyolar 8 hücreli bölünme aşamasına geldiğinde yani gebeliğin ikinci günü sonunda cervical dislokasyonla öldürülen farelerin oviductları, uteruslarının anterior dilimleri içinde 50–70 µl PBl (Modifiye Dulbecco's phosphate buffered medium) + 4 mg. / ml BSA (Bovine Serum Albumin) + 0.3 mg / ml Hyaluronidase olan petri kutularına alındılar. Özel iğneler yardımıyla içersi yıkanan oviductlardan vasata dökülen embriyolar (320 embriyo) pipet yardımıyla toplanarak 6 iri damla PBl + 4 mg / ml BSA vasatından geçirilerek yıkandılar (2,13).

Dondurma işlemine geçmeden önce embriyolar oda ısısında içersinde artan oranlarda Dimethyl sulfoxide (DMSO, Fisonas Scientific Apparatus Loughborough Leics.) olan 6 iri damla (0.25 M, 0.5 M,

0.75 M, 1.0 M, 1.25 M) PBl + 4 mg / ml BSA vasatlarından belirli sürelerle (10 dakika) geçirilerek sonuçta 1.5 M DMSO içeren PBl vasatlarına alındılar (9,12).

Daha sonra embriyolar 15–20'lik gruplar halinde 0.2 ml 1.5 M DMSO'lu final vasatlar içersinde tüplere kondu. Pyrex test tüplerinde (Durobax test tubes rimless 2x1 / 4) dondurulduldular. Tüplerin ağızları alevde kapatılıp dondurma cihazının soğutma kabinine yerleştirildiler.

Bu çalışmalar sürerken elektronik, programlanabilir dondurma cihazı Planer R202 / 101R çalıştırılıp soğutma kabini –3– — 4 C dereceye kadar soğutulmuştur (Şekil 2).

Embriyoları içeren tüplerin soğutma kabinine konulmasından sonra donma hızı 0.1 C° / dakika olarak ayarlanan cihazın kabin soğukluk göstergesi — 6 C dereceyi gösterdiğinde soğutma kabininden çıkarılan tüplerin boyun kısımlarının hemen altından vasatın sınırına yakın bir yerden daha önce sıvı azotta tutulan özel buz kristalleri oluşturma (seeding) pensi ile kristaller şekillendirildi (3,6,9). Tekrar soğutma kabinine yerleştirilen tüplerin — 33 C dereceye kadar 0.3 C° / dakikada donması beklendi. Kabin soğukluk göstergesinin — 33 C dereceyi göstermesinden sonra soğutma kabininden çıkarılan tüpler bir termos içinde cihazın yanında bekletilen sıvı azota hemen sokuldular (3, 9, 15).

Donma işleminin tamamlanmasından sonra konteynerlerde 72 saat bekletilen embriyoları içeren tüpler konteynerleden alınarak + 25 — + 30 C derecedeki su banyosuna sokulup hafif hafif çalkalandılar. Tüplerdeki vasatın erimesinden sonra bir pipet yardımıyla toplanan embriyolar dondurma öncesi soğuktan koruyucunun vasata ilavesinde kullanılan sistemin ters yönde uygulanmasıyla ve yine her aşamada 10'ar dakika bekliyerek 60 dakika sonunda PBl + 4 mg / ml BSA vasatına alındılar (3).

Dondurma işlemi uygulanmış bir iri damla PBl içindeki bu embriyolar parafinle kapatılıp 37 C derecedeki % 5'lik CO^2 ortamına yerleştirilip zona pellucidalarının açılmağa başladığı (hatching) güne kadar kontrol altında tutuldular (3,13,18).

Bulgular

Sekiz hücreli embriyolarla yapılan çalışma sonunda 13 adet dişi fareden elde edilen 320 embriyonun oda ısısında ilave edilen soğuktan

koruyucu 1.5 M DMSO ile ilk önce — 6 C dereceye kadar 0.1 C° / dakikada ve — 6 C derecede buz kristallerinin oluşturulmasından sonra — 33 C dereceye kadar 0.3 C° / dakikada, kabin soğukluk göstergesinin bu dereceyi göstermesinden sonra da hemen sıvı azota sokulmuşlardır, 3 gün süreyle — 196 C derecede saklandıktan sonra 275–500 C° / dakikada çözdürülen 320 adet embriyo 50–70 µl PBl + 4 mg / ml BSA da 37 C derecedeki % 5'lik CO^2 li ortamlarda zona pellucidalarının açıldığı 4.5 – 5. güne kadar kontrol altında tutuldular. 320 embriyodan 240 adedi (% 75) nin gelişmelerine devam ettikleri gözlenmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Dondurmanın amacı hücrenin metabolik aktivitesini sıfıra veya buna yakın en alt düzeye indirmek ve böylece hücrenin viabilitesini korumaktır. Ancak yüksek oranda canlı embriyo elde edilmesinde hücrenin büyüklüğü, hücre permeabilitesi, dondurma ve çözülme hızları, soğuktan koruyucunun seçimi ve son depolama şekli gibi pek çok faktör önemli rol oynarlar.

İlk defa glycerol'ün spermatazoonu soğuğun zararlı etkisinden koruma özelliği saptandıktan sonra DMSO, ethylene glycol, sucrose, polyvinyl pyrrolidon gibi koruyucu özelliği olan bir çok madde bulunmuş ve kullanılmıştır.

Embriyoların dondurulmasında kullanılan soğuktan koruyucular hücrenin içine girebilirler ve embriyonun korunması için hücrenin içine girmesi istenen miktar uygulama süresi ve dondurma öncesi ortamın ısısı ile düzenlenmektedir. Bu çok önemli iki faktör dışında gelişmelerinin çeşitli aşamalarında ki değişik tür embriyoların permeabilite karakteristiklerinde gösterdikleri farklılıkların bu olguda etkisi vardır (3).

Fare embriyolarının dondurulmalarında Whittingham (16) % 7.5 luk polyvinyl pyrrolidon daha sonraki çalışmalarında ise 1.5 M DMSO kullanmıştır (17,19,21,22). Miyamoto-Ishibashı (10) fare embriyolarının dondurulmasında iki değişik 1.2 M DMSO ve 1.2 M ethylene glycol soğuktan koruyucu kullanmışlardır.

Vasattaki soğuktan koruyucunun istenen konsantrasyonda olmasını da bazı araştırıcılar 2 aşamada 10 dakika sürelerle (17) sağlarlarken bazı araştırıcılar ise 3 aşamada 5 dakika (22) veya 10 dakika (19,20) sürelerle bazıları da 6 aşamada 5 dakika sürelerle (9) tamamlamışlardır.

Çalışmamızda katkı maddelerinin daha etkili bir şekilde işlevini görmesi için diğer araştırıcılardan daha farklı olarak 1.5 M DMSOe 6 aşamada ulaşılmış, embriyoların daha az zarar görebileceği düşüncesiyle de 6 aşamada uzaklaştırılmıştır. Değişik konsantrasyonlarda bu DMSO karışımlarındaki embriyolar 10 ar dakika süreyle tutulmuşlardır.

Uygun olan soğuktan koruyucuların seçimi dışında daha önce de ifade edildiği gibi memeli embriyolarının düşük ısıda saklanmasında rol oynayan iki çok önemli faktör de embriyoların dondurulmaları ve çözdürülmeleri esnasında uygulanan ısıların hızlarıdır. Farklı hücre tiplerinin dondurulma hızına gösterdikleri tepki ve etkilenmeleri çeşitli araştırıcılar tarafından ortaya konmuştur (1,4,5,8). Fare embriyoları için seçilen ısı hızları gerçekte Mazur (8) tarafından deniz kirpisi yumurtaları için hazırlanan hesaplamalara dayandırılmıştır. Bu hesaplamalarda embriyoların 1 C° / dakika ve daha yukarı da dondurulduklarında hücre içi buzun oluşacağı belirtilmişse de fare embriyoları 2 C° / dakikada dondurulduklarında yaşayabilmişlerdir. Whittingham, D.G. (17) çalışmasında embriyoları 0 C°'den — 80 C dereceye kadar 0.40 ± 0.07 C° / dakikada dondurmuş daha sonra tüpleri hemen sıvı azota sokmuştur. Schneider ve ark. (14) — 4 C derecede buz kristalleri oluşturulmasından sonra — 74 C dereceye kadar 0.2 C° / dakika ve 1.0 C° / dakika arasında, Whittingham, D.G. (19,20) örnekleri — 10 — — 65 C° arasında 0.25 C° / dakika ve 0.58 C° / dakika arasında, Miyamoto-Ishibashi (10) embriyoları — 79 C° dereceye kadar 0.5 C° / dakikada — 79 C dereceden 120 C dereceye kadar 0.3 C° / dakika ile 0.5 C° dakikada, yine Whittingham ve ark. (22) da 8 blastomerli fare embriyolarını — 10 ile — 80 C derece arasında 0.3 C° / dakika ve 0.6 C° /dakika arasında dondurmuşlar, istenen derecelere erişildikten hemen sonra sıvı azota sokmuş, saklamışlardır. Smorag ve ark. (15) embriyoları — 6 C dereceden — 40 C dereceye kadar 0.3 C° / dakikada dondurmuşlar bu aşamada 30 dakika bekledikten sonra embriyoları sıvı azota sokmuşlardır. Michaels ve arkadaşları (9) embriyoların içinde bulundukları payetlerde — 6 C derecede buz kristalleri oluşturduktan sonra — 32 C dereceye kadar 0.3 C° / dakikada dondurmuş sonra da hemen sıvı azota nakletmişlerdir.

Çözülme için Whittingham ve arkadaşları (21) — 65 C derece ve — 10 C derece arasında farklı hızlarda çözülmenin embriyolar üzerine etkisini araştırmışlardır. Schneider ve arkadaşları (17) çözülmeyi da-

kikada 5 - 15 C derece veya süratli 360 C° / dakika olacak tarzda uygulamışlardırr.

Fare embriyoları ile yapılan ilk çalışmalarda 8 blastomerli embriyo (21) ve blastosüstlerin (28,29) 1 - 10 C derece arasında dondurulduklarında hızlı çözülme (360–450 C° / dakika) canlı kalabilecekleri ortaya konmuştur. Bunun dışında inek blastosüstlerinin ilk başarılı korunması yavaş dondurma (0.22 C° / dakika) ve hızlı çözülme (360 C° / dakika) ile sağlamıştır ancak canlı kalma oranı oldukça düşük bulunmuştur (< % 10) (30). Bu nedenle hızlı çözülmenin embriyoların canlı kalmaları üzerine etkisinin, dondurma hızı ne olursa olsun, öldürücü olduğuna inanılmıştır. Yapılan son çalışmalarda uygulanan yeni yöntemlerle koyun ve inek embriyolarının — 30 C° ve — 45 C derecede dondurmayı durdurup hemen sıvı azota sokulmadan önce 0.3 C° / dakikada yavaş dondurma ve hızlı çözülme (360 C° / dakika) sonu canlı kalabilecekleri gösterilmiştir (12,23,25,26).

Çalışmamızda da embriyoların bulunduğu tüpler yavaş dondurulmuş (0.3 C° / dakika), — 6 C derecede kristalizasyon uygulanmış, — 33 C dereceye ulaşıldığında da direk olarak sıvı azota sokulmuş daha sonra 25–30 C derecedeki su banyosu kullanılarak hızlı çözülme sağlanmıştır. Literatür verilerin doğrultusunda dondurulup çözdürülen ve in vitro gelişmelerinin daha ileri aşamaları izlenen embriyolardan (320 adet) 240 (% 75) adedinin 24-48 saat sonra kültürde blastosüst aşamasına kadar geldikleri saptanmıştır. Schneider ve arkadaşları (14) fare embriyoları ile yaptıkları çalışmada 8 blastomerli embriyoların dondurulup çözdürülmeleri sonu % 54.2 sini morfolojik açıdan normal bulmuşlardır. Bu oran Whittingham, D.G. (17) için % 86, Whittingham ve arkadaşları (22) % 88, Whittingham, D.G. (19) % 74.6, Williams, T. J., Johnson, S.E. (27) % 84 dür. Görüldüğü gibi elde ettiğimiz canlı kalabilme oranı Schneider ve arkadaşlarının (14) ve Whittingham, D.G. (19) bulduklarından daha yüksek diğer araştırıcıların (17,22,27) saptadıklarından biraz düşüktür. Sonuç olarak daha önce de vurguladığımız gibi maksimum viabilitenin şekillenmesinde dondurma çözülme hızları, soğuktan koruyucuların seçimi, vasata katılmaları, son depolama biçimi gibi pek çok faktör etkilidir. Bu nedenle konu daha ileri ve daha detaylı araştırmalara açıktır.

Kaynaklar

1. **Ashwood-Smith, M.J.** (1977): *Low temperature Preservation of cells, tissues and organs.* "Low Temperature Preservation in Medicine and Biology 323 Ashwoon-Smith M.J., Farrant, J. Pitman Medical.

2. **Kılıçoğlu, Ç.** (1986). *The in vitro cultivation of mouse ova from one cell to blastocyst.* A.Ü. Vet. Fak. Derg. 32(2) 301–310.

3. **Kılıçoğlu, Ç.** (1986): *Embriyoların dondurularak uzun süre saklanması.* Lalahan Zootekni Araştırma Enstitüsü Derg. Cilt XXV, 1–4, 42–55.

4. **Leibo, S.P.** (1976): *Preservation of mammalian cells and embryos by freezing.* Cryommunologx INSERM. Vol. 62 311–334.

5. **Leibo, S.P.** (1977). *Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos.* The Freezing of Mammalian Embryos 330. Elsevier. Excerpta Medica North-Holland. Amsterdam-Oxford-Newyork.

6. **Leibo, S.P., Mazur, P.** (1978): *Methods for the Preservation of Mammalian Embryos by freezing.* Methods in Mammalian Reproduction. 555 Daniel J.C. Academic Press Newyork.

7. **Maurer, R.R.** (1978): *Freezing mammalian embryos. A review of the techniques.* Theriogenology Vol. 9 No 1 45–68.

8. **Mazur, P.** (1963). *Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intra cellular freezing.* J. Gen. Physiol. 47, 347–369.

9. **Michaelis, U., Rubin, M., Hahn, J.** (1985): *In vitro Befruchtung und weiterentwicklung von tiefgefrorenen / aufgetauten Mauseoozyten Dtsch.* Tierarztl. Wschr. 92, 1–36.

10. **Miyamato, H., Ishibashi, T.** (1977): *Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol* J. Reprod Fert. 50, 373–375.

11. **Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S.** (1949): *Revival of spermatozoa ofter vitrification and dehydration at low temperatures.* Nature (Lond.)

12. **Polge, C., Willadsen, S. M.** (1978): *Freezing eggs and embryos of farm animals.* Cryobiology 15, 370–373.

13. **Rafferty, K.A.** (1970): *Methods in experimental Embryology of the mouse.* The John Hopkins Press. London.

14. **Schneider, U., Hahn, J., Sulzer, H** (1974): *Erste Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung von Mause und Kaninchen eizellen Dtsch.* tierarztl. Wschr. 81, 445–476.

15. **Smorag, Z. Katska, L., Wierzshas, E.** (1981): *Some factors affecting the viability of mouse and cattle embryos frozen to-40°C before transfer to liquid nitrogen.* Animal Reproduction Science 4 65–72.

16. **Whittingham, D.G.** (1971): *Culture of mouse embryos.* J. Reprod. Fert. Suppl. 14, 7–21.

17. **Whittingham, D.G.** (1974): *The viability of frozen-thawed mouse blastocyts.* J. Reprod. Fert. 37, 159–162.

18. **Whittingham, D.G.** (1975). *Survival of rat embryos after freezing and thawing.* J. Reprod. Fert. 43, 575–578.

19. **Whittingham, D.G.** (1977). *Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse coocytes previously stŞred at–196°C.* J. Reprod. Fert. 49, 89–94.

20. **Whittingam, D.G.** (1977). *Some factors affecting embryo storage in laboratory animols.*" "The freezing of Mammalian Embryos". 330 Elsevier-Exceprta Medica North-Holland.

21. **Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P.** (1972): *Survival of mouse embryos frozen to–196°C and– 269°C.* Science N.Y. 178, 411–414.

22. **Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J. ,Lee, H., Halsey, J.A.** (1979): *Survival of frozen mouse embryos after rapid thawin 9 from –196°C.* J. Reprod. Fert. 56, 11–21.

23. **Willadsen, S.M.** (1972): *Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing.* The freezing of mammalian embryos 330. Elsevier Ekcerpta Medica North-Holland.

24. **Willadsen, S.M.** (1980): *Deep freezing of embryos in the large domestic species.* 9.th Int. Congress on Animal Reprod. and Artificial Insem. Vol II Madrid Spain.

25. **Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A.** (1978). *The vability of deep frozen cow embryos.* J. Reprod. Fert. 52, 391–393.

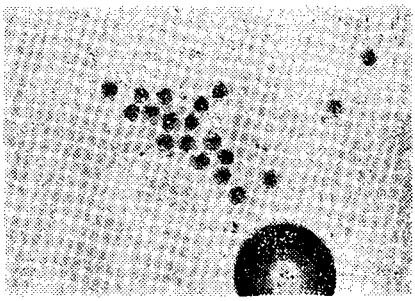
26. **Willadsen, S.M., Polge, C., Rowson, L.E.A.** (1978): *In vitro storage of cattle embryos in control of reproductin in the cow.* Commission of the European Communities 427–435.

27. **Williams, T.J., Johnson, S.E.** (1985): *Quick freezing of day four mouse embryos.* Theri ogenology Vol. 23 No. I 235.

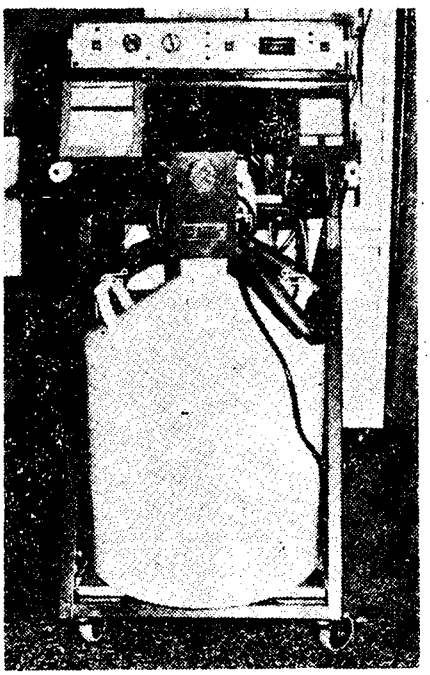
28. **Wilmut, I.** (1972): *The low temperature preservation of mammalian embryos* .J. Reprod. Fertil. 31, 513–514.

29. **Wilmut, I.** (1972): *The effect of cooling rate, warmning rate, cryoprotective agent stage of developmenton survival of mouse embryos during freezing thawing.* Life Sci 11, 1071–1079.

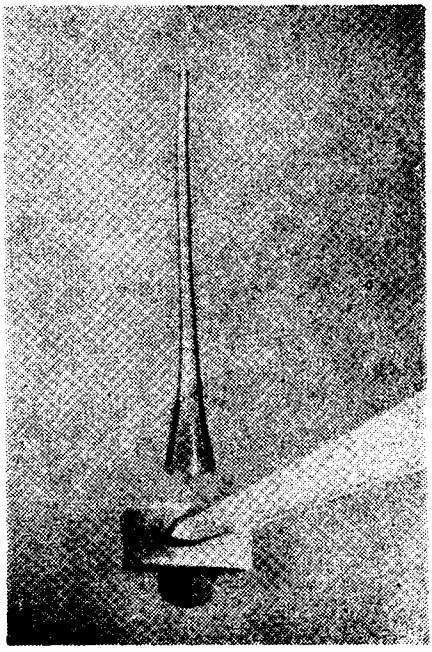
30. **Wilmut I., and Rowson L.E.A.** (1973): "*Experiments on the low temperature preservation of cow embryos*". Vet. Rec. 92: 866–690.



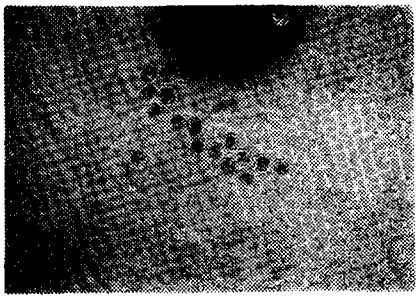
Sekil 1. Dondurma-çözülme öncesi 8 hücreli fare embriyoları.
8-cell mouse embryos before freezing and thawing.



Sekil 2. Mini dondurucu Planer R202/101R.
Mini ferezer Planer R202/101R.



Sekil 3. —6 C° de buz kristallerinin oluşturulması.
Ice induction (seeding) at — 6 C°.



Sekil 4. Çözülme sonrası morulae'lar.
Morulaes after thawing.